



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

CAMPUS DIADEMA

TATIANA SATIKO TERADA HORIMOUTI

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE REMEDIAÇÃO TÉRMICA SOBRE A
MICROBIOTA DO SOLO EM ÁREAS CONTAMINADAS POR COMPOSTOS
ORGÂNICOS

DIADEMA

2019

TATIANA SATIKO TERADA HORIMOUTI

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE REMEDIAÇÃO TÉRMICA SOBRE A
MICROBIOTA DO SOLO EM ÁREAS CONTAMINADAS POR COMPOSTOS
ORGÂNICOS

Dissertação apresentada como exigência parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de concentração: Análise Ambiental
Integrada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* do Instituto de Ciências Ambientais,
Químicas e Farmacêuticas da Universidade
Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Rossi
Nakayama

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Gardenalli de
Freitas

DIADEMA

2019

Horimouti, Tatiana Satiko Terada
Efeitos da Aplicação de Remediação Térmica na Microbiota do Solo de
Áreas Contaminadas por Compostos Orgânicos / Tatiana Satiko Terada Horimouti –
Diadema, 2019.
53 f.

Dissertação de mestrado (Análise Ambiental Integrada) - Universidade
Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2016.

Orientadora: Cristina Rossi Nakayama
Orientadora: Juliana Gardenalli de Freitas

1. Solo. 2. Contaminadas. 3. Bactérias. 4. Remediação. 5. Térmica.

I. Título.

CDD 628.55



Serviço Público Federal
Universidade Federal de São Paulo
Pró – Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nome: TATIANA SATIKO TERADA HORIMOUTI
Campus: DIADEMA

Data e Local: 13/12/2019 às 14h00 na Sala 16 – Unidade José Alencar – Complexo Didático -
Campus Diadema – Av. Conceição, 515 – Centro – Diadema – SP.

DISSERTAÇÃO: “Efeitos da Aplicação de Remediação Térmica sobre a Microbiota do Solo
e, Áreas Contaminadas por Compostos Orgânicos”.

MEMBROS TITULARES

- Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos [CPF 256.624.838-92]
Professora Adjunta
Universidade Federal de São Paulo

- Prof. Dr. Gunther Brucha [CPF 103.364.368-82]
Professor Associado II
Universidade Federal de Alfenas

- Profa. Dra. Mirian Chieko Shinzato [CPF 103.364.368-82]
Professor Associado II
Universidade Federal de São Paulo

SUPLENTE

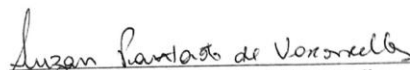
- Profa. Dra. Mércia Regina Domingues Moretto [CPF 149.660.378-83]
Professora Adjunta
Universidade Federal do ABC

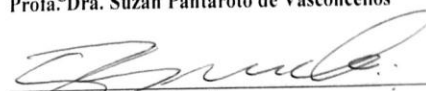


Serviço Público Federal
Universidade Federal de São Paulo
Pró – Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera o(a) aluno(a) **TATIANA SATIKO TERADA HORIMOUTI** Aprovada (Aprovada/Reprovada) a receber o título de **MESTRE EM CIÊNCIAS** pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. E, por estarem de acordo, assinam a presente ata.

São Paulo, 13 de Dezembro de 2019.


Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos


Prof. Dr. Gunther Brucha


Profa. Dra. Mirian Chieko Shinzato


Profa. Dra. Cristina Rossi Nakayama

Malfeito, feito!

*Harry Potter e o Prisioneiro
de Azkaban*

Agradecimentos

Talvez a parte mais difícil de escrever.

Agradeço primeiro a minha família que sem ela não teria chegado até este momento da minha vida e da minha carreira, com carinho especial aos meus pais, Elza e Laurindo, que tanto sacrificaram ao longo desses anos para que tudo isso acontecesse.

As minhas orientadoras Cristina Rossi Nakayama (espero ter escrito seu nome certo) e Juliana Gardenalli de Freitas pela paciência, correções, ensinamentos e incêndios em muflas. Levo vocês no coração. Obrigada por não terem desistido de mim.

Ao meu companheiro de alma, Bruno Gatti. Você me enche de orgulho e tudo que eu busco é te deixar orgulhoso de mim também. Citando Carl Sagan, diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer dividir um planeta e uma época com você.

Aos amigos de laboratório, que tornaram mais leves os dias mais escuros dessa longa caminhada, em especial ao meu quase co-orientador Vitor Vital, presente que a vida me deu. Obrigada amigo, por estar comigo nessa caminhada. Te devo coxinha de brigadeiro.

À CAPES pela bolsa concedida.

E por fim, a todos os funcionários da UNIFESP – Diadema pelo ambiente de trabalho fornecido.

Resumo

Diante da industrialização e expansão urbana no Brasil, diretamente ligada a uma desorganização do espaço físico e a um conjunto de processos ambientalmente insustentáveis como uso e ocupação do solo sem consideração aos parâmetros de proteção ambiental, cresce anualmente o reconhecimento de áreas contaminadas, comprometendo diversos aspectos sociais e ambientais. Com a evolução dessa problemática, diversas técnicas para a remediação dessas áreas foram desenvolvidas, como a remediação térmica, que consiste na aplicação de calor para remoção de contaminantes presentes no solo. Este trabalho buscou compreender como a remediação térmica afeta a microbiologia de solos tipicamente brasileiros, sendo testados dois tipos de solo: sem contaminação e com contaminação. Para isso, foram elaborados microcosmos com os solos, submetidos a diferentes temperaturas (350°, 270°, 100° e 60°C) e incubados a temperatura ambiente por até 90 dias, seguido de quantificações por meio da técnica da microgota e coloração DAPI. Por meio dessas quantificações, percebe-se que em um ambiente controlado, nas temperaturas de 350°C e 270°C ocorre a esterilização do solo, a 100°C e a 60°C o crescimento de células em placa de Petri é condicionada ao tempo em que o solo é submetido ao aquecimento e as propriedades físico-químicas que são alteradas nessas temperaturas que também são fatores que influenciam na recolonização do solo após o impacto do aquecimento. Por meio dos resultados obtidos, entende-se que em um ambiente controlado, a remediação térmica em altas temperaturas esteriliza o solo e nas temperaturas mais brandas limita o crescimento dos micro-organismos. Em temperaturas acima de 270°C e com 1 hora de aquecimento, a comunidade microbiana não foi capaz de restaurar sua densidade após 60 dias de incubação. São necessários mais estudos para compreensão de como a diversidade dessa comunidade é também afetada pelo aquecimento.

Palavras-chave: solo, contaminadas, bactérias, remediação, térmica.

Abstract

Given the industrialization and urban expansion in Brazil, directly linked to a disorganization of the physical space and a set of environmentally unsustainable processes such as land use and occupation without regard to the parameters of environmental protection, the recognition of contaminated areas grows annually, compromising several social and environmental aspects. With the evolution of this complex issue, several techniques for the remediation of these areas were developed, such as thermal remediation, which consists in the application of heat to remove contaminants present in the soil. This work aimed to understand how thermal remediation affects the microbiology of typically Brazilian soils, being tested two types of soil: without contamination and with contamination. For this, microcosms were elaborated with the soils, submitted to different temperatures (350°, 270°, 100° and 60°C) and incubated at room temperature for up to 90 days, followed by quantification by the micro drop technique and DAPI staining. Results showed that in a controlled environment, at temperatures of 350°C and 270°C, soil sterilization occurred, at 100°C and 60°C the growth of cells in Petri dish was conditioned to the time the soil was subjected to heating and the physicochemical properties that were altered at these temperatures, which are also factors that influence the recolonization of the soil after the impact of the heating. From the results obtained, it was concluded that in a controlled environment, high temperature thermal remediation sterilizes the soil and at milder temperatures limits the growth of microorganisms. In temperatures above 270°C and after 1 hour of heating, microbial density was not recovered after 60 days of incubation. Further studies are needed to understand how the diversity of this community is affected by heating.

Keywords: soil, contamination, bacteria, remediation, thermal.

Sumário

1	Introdução	11
2	Justificativa	14
3	Hipóteses	15
4	Objetivos	16
5	Revisão Bibliográfica.....	17
5.1	<i>Microbiologia do Solo</i>	17
5.2	<i>Remediação Térmica</i>	20
6	Materiais e Métodos	24
6.1	<i>Áreas de estudo e amostragem de solo</i>	24
6.2	<i>Solo Não Contaminado</i>	26
6.2.1	<i>Experimento em Modelo Físico (Aquecimento em Coluna)</i>	26
6.2.2	<i>Microcosmos para o Aquecimento</i>	27
6.3	<i>Solo contaminado: experimento em microcosmos</i>	28
6.4	<i>Análises da microbiota do solo nos microcosmos</i>	29
6.4.1	<i>Contagem de Bactérias heterotróficas totais pela técnica da microgota</i>	29
6.4.2	<i>Contagem de bactérias heterotróficas totais pela coloração DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol)</i>	30
7	Resultados e Discussão	31
7.1	<i>Análise do solo após o aquecimento</i>	31
7.2	<i>Método dependente do cultivo: solo sem contaminação</i>	31
7.3	<i>Método dependente do cultivo: solo contaminado</i>	37
7.4	<i>Método independente do cultivo</i>	42
8	Conclusões e recomendações	45
9	Referências Bibliográficas	46
	Anexo 1 – Protocolo para coloração DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo)	53

1 Introdução

As questões atuais de poluição urbana no Brasil remetem a um passado histórico marcado pelo modelo de industrialização e expansão urbana que influencia diretamente na organização do espaço físico urbano, como por exemplo, o número de áreas de disposição inadequada de resíduos sólidos, culminando na ocorrência de áreas degradadas e contaminadas (GÜNTHER, 2006). O surgimento de áreas contaminadas – um caso particular de área degradada, em que a concentração de contaminantes no solo ou na água subterrânea ultrapassa valores de referências legais - é o resultado de um conjunto de processos ambientalmente e socioeconômicos insustentáveis como o uso e ocupação do solo sem consideração aos parâmetros de proteção ambiental (GÜNTHER, 2006), sendo que essas áreas podem estar associadas a problemas como: danos à saúde, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização da propriedade, além de danos ao meio ambiente (SÃO PAULO, 2018). A evolução desse tema integra questões que envolvem a revitalização urbana e a qualidade das águas, estimulando a requalificação urbana e ressaltando a questão do abastecimento de água, uma vez que 39% dos municípios brasileiros são abastecidos por águas subterrâneas (SÁNCHEZ, 2004; BRASIL, 2013). Portanto, essas áreas necessitam passar por um processo de remediação, eliminando o risco ou tornando-o aceitável à saúde (ROCCA, 2006). Contaminações por compostos orgânicos representam um risco à saúde humana, impedindo o uso residencial e comercial dessas áreas, além do fato de que a contaminação pode migrar através do ar, solo ou água afetando muito além da área em que se iniciou a contaminação.

Desde 2002 a Companhia Ambiental de São Paulo (CETESB) divulga a lista de áreas contaminadas, registrando inicialmente a existência de 255 áreas contaminadas no Estado de São Paulo (VALENTIM, 2011). O registro das áreas contaminadas é anualmente atualizado e em dezembro de 2018, sua última atualização, foi contabilizada 6.110 registros no Cadastro de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2018). Os principais grupos de contaminantes encontrados refletem os principais tipos de atividades exercidas nessas áreas (postos de combustível e áreas industriais), sendo encontrados solventes aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), combustíveis automotivos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais e solventes halogenados (SÃO PAULO, 2018).

Dessa necessidade de recuperar ou remediar as áreas degradadas, uma ampla gama de técnicas e metodologias foi desenvolvida, fazendo com que a indústria de remediação ambiental crescesse de suas pequenas origens no final dos anos 1970 para ser uma indústria de bilhões de dólares durante as últimas quatro décadas (SUTHERSAN et al., 2016). Com a aplicação dessas diversas técnicas de remediação amplia-se também o conhecimento e o levantamento de informações referente as eficiências e limitações de cada técnica. Ao se iniciar o processo de escolha da melhor técnica de remediação, é necessário um levantamento detalhado das condições hidrogeológicas do local a ser remediado, a caracterização dos contaminantes, principalmente considerando seus aspectos de degradação e sua reatividade físico-químico com solo, água e ar. Importante ressaltar também que é possível combinar diferentes técnicas para a remediação de uma área contaminada e que a escolha da melhor técnica para cada caso de área contaminada esteja de acordo com o orçamento estipulado, já que algumas áreas podem levar anos até serem consideradas remediadas.

Uma classe de tecnologias que vem ganhando cada vez mais popularidade é o tratamento térmico *in situ*, que se concentra na remoção de fontes da contaminação, sendo esse tipo de tratamento capaz, muitas vezes, de acelerar o processo de limpeza de uma área de anos a meses (DETTMER, 2002). Os métodos térmicos podem ser particularmente úteis para líquidos em fase não-aquosa (*non-aqueous phase liquids*: NAPLs) e o calor pode ser introduzido no subsolo por aquecimento por resistência elétrica, aquecimento por radiofrequência, condução térmica ou injeção de água e ar quente (CLU-IN, 2017).

Os processos térmicos ainda são considerados emergentes para a remediação no Brasil. A aplicação desses processos ainda é limitada pela escassez de estudos voltados para esse tipo de tecnologia, principalmente em solos em ambientes tropicais, necessitando de estudos que compreendam a interação entre o aquecimento do solo e sua influência em aspectos físicos, mineralógicos e microbiológicos do solo.

É largamente reconhecido que as plumas de águas subterrâneas contaminadas são estabilizadas ou reduzidas, pelo menos até certo ponto, por processos naturais de atenuação (biodegradação, dispersão, sorção, volatilização e mecanismos de degradação abiótica) sendo a biodegradação talvez a mais importante porque representa a redução real da massa contaminante (USACE, 2014). Embora a biodegradação *in situ* possa ter

impacto limitado na remoção da fonte de contaminante, existe o potencial de redução de contaminantes mediada biologicamente para auxiliar projetos de remediação térmica, tanto durante o tratamento quanto após o tratamento, durante o monitoramento, resultando na redução de plumas de contaminantes durante e após a remediação térmica (USACE, 2014).

A ocorrência e abundância de micro-organismos em um ambiente particular é controlado por complexas interações de nutrientes associados com fatores físicos e químicos (temperatura, pH, etc.), presente no ambiente ao longo do tempo (PAUL, 2007). Consequentemente, a presença e o sucesso de um organismo específico ou uma comunidade microbiana responsável pela degradação de hidrocarbonetos em um ecossistema subterrâneo contaminado dependem tanto dos nutrientes quanto da tolerância da gama de condições físicas e químicas presentes, sendo a temperatura um dos principais fatores físicos que controlam a distribuição e abundância de micro-organismos.

Estudos discutem os efeitos da remediação térmica em processos de degradação microbiana (DETTMER, 2002; FLETCHER et al., 2011; USEPA, 2014; FRISS, 2006; COSTANZA et al., 2005; e BADIN et al., 2016), estabelecendo uma relação entre o aquecimento do subsolo por processos de remediação térmica e um aumento da atividade metabólica ou diminuição da diversidade genética microbiana. Embora as condições durante o tratamento térmico sejam agressivas, alcançando altas temperaturas, alguns micro-organismos sobrevivem e são capazes de degradar vários hidrocarbonetos (FRISS, 2006). Integrando conhecimentos relacionados com o processo de remediação e seus impactos na microbiologia do solo, será possível fazer com que as áreas remediadas ofereçam benefícios ambientais e econômicos, além de reduzir os riscos ambientais.

2 Justificativa

A remediação térmica se apresenta como uma das alternativas para a remediação de áreas contaminadas e, por ser uma técnica em consolidação no Brasil, os efeitos do aquecimento de solos tropicais é desconhecida. Discute-se que as temperaturas alcançadas nesse processo de remediação causam a eliminação dos micro-organismos existentes, tornando essa técnica mais prejudicial do que benéfica, ao eliminar a população microbiana do solo que exerce inúmeras funções ecológicas até mesmo na atenuação natural dos contaminantes. Em contrapartida, o calor em processo de remediação térmica não se distribui de forma uniforme, criando gradientes de temperatura, considerando que os grupos bacterianos possuem diferentes faixas de temperatura ótimas de crescimento, ao elevar a temperatura, aqueles micro-organismos que não forem inativados poderão ser estimulados pelo calor e terão uma maior atividade metabólica. Resumindo, o aumento da temperatura pode gerar um impacto negativo ao inativar micro-organismos que exercem diversas funções no solo nos pontos em que as temperaturas forem mais altas, assim como podem existir faixas de temperatura ao longo do gradiente formado em que o crescimento microbiano é estimulado, melhorando, assim, o processo de degradação. Estudos dos impactos que esse tipo de remediação causa na microbiota de solos tropicais tornam-se, então necessárias para aprimorar conhecimentos estratégicos que norteiam a adoção ou não desse tipo de técnica para remediação de áreas contaminadas.

3 Hipóteses

Considerando que: os processos microbianos são dependentes das características do ambiente; a temperatura possui um papel fundamental na regulação do metabolismo e na sobrevivência das células; espécies microbianas distintas apresentam preferências e tolerâncias distintas quanto à temperatura; a variação da temperatura no ambiente afeta a comunidade microbiana de diferentes maneiras, determinando quais os grupos de micro-organismos são capazes de sobreviver nesse ambiente particular e promovendo mudanças em suas atividades celulares. Portanto, este trabalho atua sobre a seguinte hipótese:

- O gradiente de temperatura gerado pelo tratamento térmico resulta na ocorrência de áreas em que se observa a eliminação dos micro-organismos do solo e áreas em que pode ocorrer estímulo da atividade microbiana.

4 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é investigar o impacto do aquecimento promovido pela simulação da remediação térmica na microbiota do solo. Para isso, têm-se os seguintes objetivos específicos que devem ser cumpridos:

- Investigar os efeitos sobre as densidades das populações microbianas, realizando contagens por meio da técnica da microgota;
- Analisar os efeitos da temperatura sobre as populações microbianas, por meio de contagens de células coradas com corante DAPI (4',6'-diamidino-2fenilindol) e observadas em microscópio de fluorescência; e
- Determinar faixas de temperatura em que ocorre inativação, inibição ou estímulo da atividade microbiana.

5 Revisão Bibliográfica

5.1 *Microbiologia do Solo*

A camada superficial da Terra, na interface entre a litosfera e a atmosfera, conhecida como solo, sustenta a vida de mais de 10^9 UFC (unidades formadoras de colônias) por grama de solo, representando uma biomassa de 3000 kg por hectare (TORSVIK et al., 1989). As bactérias não só desempenham um papel fundamental no funcionamento biológico do solo por meio do seu envolvimento nos ciclos biogeoquímicos, como também tem papel fundamento nos primeiros passos da formação do solo pela alteração da rocha e na estruturação do solo (RAJARD; RICHAUME, 2001). Entender como as características do solo controlam as atividades dos micro-organismos é essencial para prever a ocorrência e taxa de funções microbiológicas de importância ambiental, tais como mineralização de nitrogênio, estabilidade da estrutura do solo, biodegradação de poluentes orgânicos, etc. (CHENU; STOSKY, 2002). Os componentes minerais (areia, silte e argila) são organizados em agregados que diferem em tamanho, forma e estabilidade, sendo a coesão entre as partículas assegurada por agregados orgânicos, sendo essa interação entre os componentes minerais e orgânicos responsáveis pela estrutura do solo.

Ao pensar na microbiologia do solo, é essencial considerar cuidadosamente a natureza do ambiente nos quais os micro-organismos se encontram. A estrutura organizacional das partículas sólidas resulta em um mosaico de ambientes, um complexo padrão de poros e espaços com vários tamanhos e formas que são mais ou menos preenchidos com água ou ar, diferindo em suas características estruturais e físico-químicas (RAJARD; RICHAUME, 2001; CHENU; STOSKY, 2002), sendo que essas forças desempenham um papel nas dinâmicas das populações microbianas do solo. A vida microbiana ocorre nos poros, representando até 50% do volume total do solo, o qual esse volume depende mais do tamanho, forma e estabilidade dos agregados do que das partículas minerais do solo (WU et al., 1990). Esses poros são ocupados por uma fase aquosa descontínua, exceto quando o solo é saturado, transportando substâncias inorgânicas ou orgânicas dissolvidas e a fase gasosa (RAJARD; RICHAUME, 2001). A proporção relativa de líquido e gás, os quais afetam os fenômenos aeróbios e anaeróbios, depende da saturação do solo e da circulação na rede de poros.

As interações entre os micro-organismos e as partículas do solo podem ser classificadas em biológicas e não-biológicas. As interações biológicas envolvem o crescimento e a multiplicação de células e a produção de substâncias orgânicas, como enzimas e outros biopolímeros (CHENU; STOZKY, 2002). As interações não-biológicas envolvem interações físicas, relativa à geometria e à coesão da matriz do solo, incluindo, por exemplo, distribuição do tamanho dos poros, retenção de água, estabilidade do agregado e as propriedades mecânicas do solo, sendo dependentes do tamanho, forma e arranjo espacial das partículas do solo, assim como suas propriedades na superfície (CHENU; STOZKY, 2002). Interações físico-químicas incluem processos nas interfaces ou na solução do solo, como por exemplo, sorção, dissolução, hidrólise, oxidação e a partir da variação de parâmetros como o pH e potencial de oxido-redução.

As interações entre os micro-organismos e as partículas do solo são bidirecionais, ou seja, as partículas do solo influenciam a sobrevivência e na atividade biológica dos micro-organismos, controlando parcialmente a geometria dos poros os quais os micro-organismos habitam e as condições físico-químicas (CHENU; STOZKY, 2002). Já os micro-organismos afetam as partículas do solo, modificando seu arranjo, agregando ou desgastando as partículas minerais ou contribuindo para a precipitação e formação de novas partículas minerais e degradando partículas orgânicas (CHENU; STOZKY, 2002).

Bactérias raramente estão livres na fase líquida do solo, pois a maioria das células adere a partículas de argila e matéria orgânica, sendo que as interações superficiais dos micro-organismos com as partículas do solo envolvem várias etapas: (i) transporte para a superfície, (ii) contato e adesão inicial, (iii) fixação mais firme, e, então, (iv) crescimento, formando microcolônias aderentes ou biofilmes. A adesão inicial é rápida (segundos ou minutos) e pode ser reversível ou irreversível (CHENU; STOZKY 2002). As bactérias e as partículas coloidais do solo são atraídas umas pelas outras, sendo um efeito em parte da atração eletrostática do solo e bactérias. Essa adsorção resulta em uma diminuição no número de bactérias que passam pelo solo em água corrente e causa sua retenção no solo (ALEXANDER, 1961).

Condições ambientais afetam a densidade e composição da comunidade microbiológica e fatores não-biológicos podem frequentemente estar associados a alterações na população natural e seu potencial bioquímico. As variáveis ambientais

primárias que influenciam as bactérias do solo incluem umidade, aeração, temperatura, matéria orgânica, pH e suprimento de nutrientes inorgânicos (PAUL, 2007).

A umidade atua na atividade microbiológica de duas maneiras: a água é fundamental para a constituição das bactérias, sendo sua composição entre 80 a 90% de água, além de fornecer a maioria dos nutrientes necessários para seu crescimento, mas quando a umidade se torna excessiva, as trocas gasosas são reprimidas, resultando em baixas taxas de oxigênio disponível. Com a umidade excessiva cria-se assim um ambiente anaeróbio, que inibe o crescimento de micro-organismos aeróbios e favorece o estabelecimento de microbiota anaeróbia ou facultativa (TORTORA, et al., 2002; ALEXANDER, 1961).

O carbono é um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano, por ser o esqueleto estrutural da matéria viva: um composto orgânico necessário para se constituir uma célula viva. Metade do peso seco de uma célula bacteriana típica é composta por carbono (TORTORA, et al., 2002). Além do carbono, os micro-organismos necessitam de outros elementos para sintetizar material celular, como a síntese de DNA e RNA que requer nitrogênio e fósforo, e a síntese de ATP (Trifosfato de Adenosina), molécula responsável pelo armazenamento e pela transferência de energia dentro da célula. O nitrogênio constitui cerca de 14% do peso seco da célula bacteriana em que as bactérias utilizam essencialmente para formar aminoácidos, e outros elementos como enxofre e fósforo, constituem cerca de 4% (TORTORA, et al., 2002).

A temperatura controla todos os processos biológicos e, por isso, é um fator primário no que concerne as bactérias. Cada espécie bacteriana cresce a uma temperatura mínima, menor temperatura na qual a espécie pode crescer; temperatura ótima é a melhor temperatura para o crescimento; e máxima específica, sendo a maior temperatura na qual o crescimento é possível. Essa relação pode ser observada na Figura 1 em que os micro-organismos são classificados em três grupos principais com base em sua faixa preferida de temperatura: psicrófilos (possuem crescimento ótimo em baixas temperaturas), mesófilos (crescem otimamente em temperaturas moderadas) e termófilos (apresentam crescimento ótimo em altas temperaturas) (TORTORA, et al., 2002).

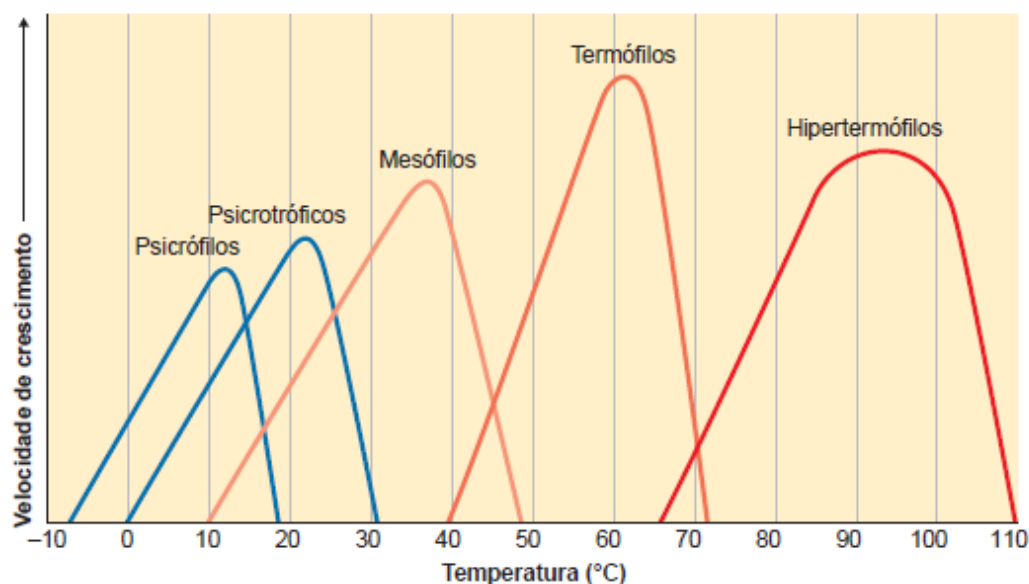


Fig. 1: Relação entre as velocidades de crescimento característico de diferentes micro-organismos em resposta à temperatura (Fonte: TORTORA, et al., 2002)

O tamanho populacional em solos minerais também está diretamente relacionado com o conteúdo da matéria orgânica. Condições de alta acidez ou alcalinidade tendem a inibir o crescimento de bactérias, pois o ideal para a maioria das espécies é próximo da neutralidade, entre pH 6,5 e 7,5, considerando que quanto maior a concentração de íons de hidrogênio, menor é o tamanho da população de bactérias (TORTORA, et al., 2002).

5.2 Remediação Térmica

A remediação térmica é uma tecnologia que se baseia no aquecimento direto do solo para o tratamento para solos e água subterrânea contaminada (USACE, 2014). Esse processo geralmente ocorre em duas partes: dessorção primária e incineração secundária. A transferência de massa e de calor são etapas comuns limitadoras do processo de dessorção (LIGTHY, et al., 1990).

As origens de várias técnicas de remediação térmica podem ser traçadas até a indústria do petróleo, em que a injeção de vapor era utilizada para melhorar a recuperação do óleo do solo, técnica utilizada por várias décadas, sendo aprimorada com o objetivo de remediar solos e águas subterrâneas contaminadas em 1980 na Holanda (1986) e nos Estados Unidos (1989) (USACE, 2014).

Como apresentado no relatório anual de relação de áreas contaminadas formulado pela CETESB (SÃO PAULO, 2018), existe um número significativo de

áreas contaminadas com um alto nível de contaminantes orgânicos, incluindo solventes halogenados, óleos e derivados de petróleo, PCBs, solventes aromáticos entre outros compostos acima ou abaixo do nível d'água, sendo que muitos desses locais são conhecidos ou suspeitos de conter líquidos de fase não aquosa (NAPLs), como fluídos imiscíveis móveis ou residuais. Alguns compostos possuem baixa volatilidade e solubilidade, especialmente os LNAPLs (líquidos menos densos que a água), acima do nível d'água, implicando em uma dificuldade de ser tratado com tecnologias de remediação mais convencionais como extração da água subterrânea, biorremediação e extração de vapor do solo (USACE, 2014). NAPL geralmente representam uma fonte de contaminação de fase dissolvida muito significativa de longo prazo (décadas a séculos). É importante destacar que a eficiência da remoção de um contaminante sob as mesmas condições de aquecimento podem variar devido às características específicas do solo de cada local de remediação, como textura do solo, mineralogia, teor de água e matéria orgânica. São essas características que influenciam diretamente no sucesso da remediação térmica e da mesma forma, também são os parâmetros que indicam os impactos nas propriedades do solo (O'BRIEN et al., 2018).

Diante dessa problemática, novas tecnologias foram desenvolvidas como os métodos de oxidação química *in situ*, injeção de surfactante/solvente e técnicas de remediação térmica, sendo este último método o mais agressivo e eficaz dessas técnicas (USACE, 2014). Apesar da sua eficiência e seu maior controle sobre os parâmetros operacionais, como tempo de aquecimento e temperatura, a remediação térmica não é aplicável em todas as situações, sendo mais indicada quando as metas de remediação incluem i) remoção rápida de contaminantes; ii) adesão estrita a uma meta de remediação, exigindo alta confiabilidade dos resultados; e iii) redução do passivo a longo prazo. (O'BRIEN et al., 2018). A remediação térmica é uma categoria de técnicas que se utilizam a aplicação do calor de quatro formas principais: i) aumentar a mobilidade dos contaminantes (injeção de vapor/ar quente); ii) promover a separação dos contaminantes das partículas do solo (dessorção térmica, aquecimento por micro-ondas; iii) transformar os contaminantes em subprodutos menos tóxicos (pirólise); e iv) destruir contaminantes (incineração) (VIDONISH et al., 2016). Existe também uma quinta técnica, mais incomum, seria a imobilização por meio de vitrificação (KAHN, et al., 2014). Deve-se também considerar os efeitos do aquecimento a temperaturas abaixo de 100°C, que podem incentivar o aumento da degradação de contaminantes por meio

de processos biológicos (ZEMAN, et al., 2014). Na prática, as técnicas de remediação empregam várias dessas quatro vias, mas cada técnica possui circunstâncias particulares de contaminação às quais ela é mais adequada. O objetivo da remediação não é expor os solos contaminados a cada uma delas, mas sim otimizar a redução de contaminantes através de qualquer via que seja mais eficiente.

Apesar de ser um processo mais rápido e mais confiável, a instalação da remediação térmica exige mais infraestrutura e maquinários, resultando em maiores custos. Além disso, o aquecimento do solo é reconhecido por afetar numerosas propriedades do solo, sendo a extensão destas alterações um importante fator na escolha da implantação da remediação térmica, tendo em mente que muitos projetos atrelam essa técnica com esforços subsequentes de recuperação ou restauração ambiental (O'BRIEN et al., 2018). Por isso, entender os efeitos da remediação térmica nas propriedades do solo se torna uma informação crítica no processo de tomada de decisão que ocorre no início de um projeto de remediação.

Os objetivos e as particularidades de cada projeto de remediação térmica determinam como os efeitos do aquecimento para as funções do solo podem ser relevantes ou não no gerenciamento de projetos de remediação. Por exemplo, se o objetivo final é garantir o uso comercial ou industrial do solo, então, a produtividade potencial esperada desse uso do solo pode ser considerada como uma baixa prioridade, desse modo, os efeitos do aquecimento não são tão relevantes. No entanto, a resistência e a estabilidade do solo são essenciais quando utilizados como meio de engenharia ou construção, já projetos de remediação em terras agrícolas ou naturais podem ter como meta restaurar a terra a um estado de pré-perturbação, de modo que as metas de recuperação possam se concentrar nas funções de habitat, produção de biomassa, manejo da água e ciclagem de nutrientes (O'BRIEN et al., 2018).

As duas condições controladas em um processo de remediação térmica são a temperatura alcançada e o tempo de aquecimento. Garantir que os solos contaminados alcancem a temperatura adequada para remover o contaminante é muitas vezes um desafio devido às propriedades térmicas do solo (USACE, 2014). O solo é uma matriz heterogênea, e a transferência de calor não é uniforme devido à variabilidade no tamanho dos poros, conteúdo de água e composição dos materiais sólidos (LU et al., 2014), assim características específicas do local como a textura do solo, mineralogia ou

teor de umidade determinam as condições ótimas de aquecimento para a remediação térmica, que, por sua vez, determinam os impactos nas propriedades do solo. Solos com alto teor de água, porosidade e matéria orgânica do solo possui menor condutividade térmica do que solos secos e densos (ABU-HAMDEH; REEDER, 2000), portanto, é necessária mais energia para aquecer materiais uniformemente nesses solos, exigindo temperaturas mais altas ou tempos de aquecimento mais longo.

Como as duas principais variáveis controláveis nos processos de remediação térmica são a temperatura alcançada e o tempo de exposição em que o solo é submetido, os efeitos causados estão relacionados. Mesmo em temperaturas próximas de 100°C, a remediação afeta a biota do solo, eliminando propágulos de plantas, a macrofauna e os microrganismos (PAPE et al., 2015). Conforme a temperatura do tratamento aumenta, outros impactos ocorrem, como carbonização, perda de matéria orgânica e perdas atmosféricas de nitrogênio, sendo essas perdas quase completas em temperaturas acima de 500°C, temperatura essa em que os minerais de argila se decompõem e agregam, alterando fisicamente o solo. Essas alterações físicas nos minerais de argila e perda de matéria orgânica reduzem a capacidade do solo de reter nutrientes importantes. O conjunto dessas alterações no solo pode ter efeito significativo na capacidade dos solos de sustentar comunidades microbiológicas acarretando em impactos na ciclagem de nutrientes, decomposição orgânica e, em uma área contaminada, a continuidade da biorremediação dos contaminantes residuais (CÉBRON et al., 2009).

6 Materiais e Métodos

6.1 *Áreas de estudo e amostragem de solo*

Para a realização dos experimentos foram coletados dois tipos de amostras de solo: o primeiro solo de uma área não contaminada, no município de Diadema, São Paulo, em área da Universidade Federal de São Paulo, com as coordenadas geográficas Coordenadas UTM 23K: 334072; 7380004 e altitude igual a 708 metros e sua localização pode ser vista na Figura 2.



Fig. 2: Localização do município de Diadema, área de coleta de amostras de solo sem contaminação.

O clima é definido como Cwa – clima tropical de altitude com chuvas no período de outubro e março, e seca entre abril e setembro de acordo com a classificação de Köppen. Para os testes em microcosmos, as amostras foram coletadas com trado manual a uma profundidade entre 1,55 m e 2,88 m, sendo caracterizado nessa profundidade como o Horizonte C, de acordo com a classificação realizada por Gomes (2019), constituído do produto da alteração direta da rocha matriz (granito) e por se tratar de um local onde as ações de remediação geralmente acontecem e possuem a tendência de acumular contaminantes (RODRIGUES, 2019). O solo coletado foi armazenado em sacos transparentes, abrigados da luz e mantidos em temperatura ambiente.

O segundo solo foi coletado de uma área contaminada em processo de remediação na zona oeste do município de São Paulo, no bairro da Barra Funda, terreno onde operou a garagem de uma companhia de transportes coletivos por 5 décadas, com uma área de aproximadamente 9.500,00 m², sua localização encontra-se na Figura 3.

Atualmente não há atividade na área, todas as edificações foram demolidas e não há registros de outras atividades exercidas historicamente no local.

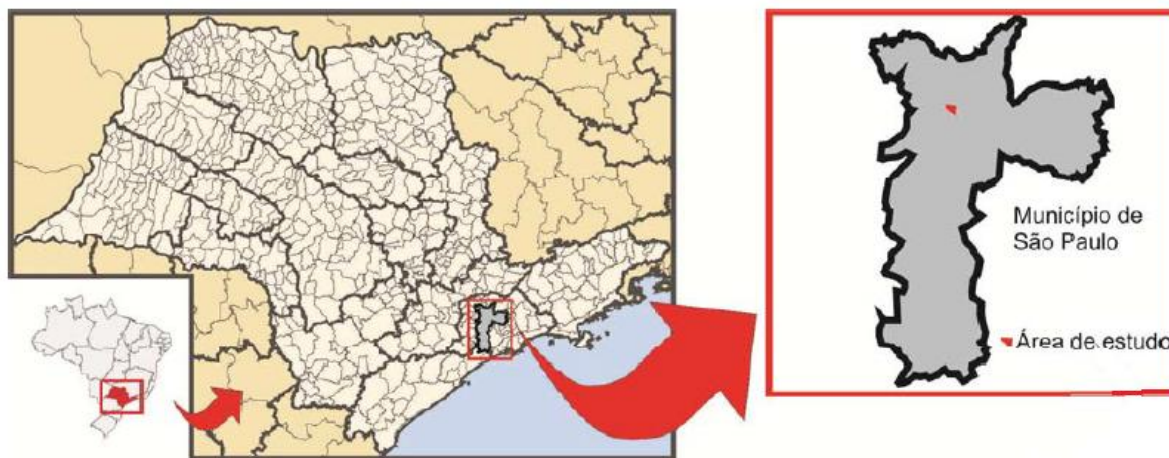


Fig. 3: Localização da área da segunda coleta realizada na cidade de São Paulo, com o solo contaminado.

Essa área conta com as seguintes contaminações: presença de fase livre com características de óleo diesel; no solo foram detectadas concentrações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) total acima dos valores de intervenção; na água subterrânea concentrações acima dos valores de intervenção para chumbo, cloreto de vinila e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), compostos derivados de óleos combustíveis. Os valores de referência para intervenção de acordo com a CETESB (2016) e as concentrações encontradas na área contaminada estão organizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Relação de contaminantes encontrados no solo, seus valores de referência como determina a Decisão de Diretoria N° 256/2016 da Cetesb e seus respectivos pontos de ebulição.

Contaminante	Valor Referência*	Concentrações encontradas*	Ponto de ebulição
Chumbo	10	21,90	1750 °C
Cloreto de Vinila	2	4,6	-13,4 °C
Benzo(a)antraceno	0,4	1,32	438 °C
Benzo(a)pireno	0,7	1,58	495 °C
Benzo(b)fluoreanteno	0,4	1,78	480 °C
Dibenzo(a,h)antraceno	0,04	0,24	524 °C
Indeno (1,2,3,cd)pireno	0,4	0,96	536 °C
TPH Total	--	22.000,00	

*Valores para água subterrânea apresentadas nas concentrações µg/L.

6.2 Solo Não Contaminado

6.2.1 Experimento em Modelo Físico (Aquecimento em Coluna)

Este trabalho é resultado de uma parceria entre a autora e o aluno de mestrado Fábio Minzon Rodrigues, aluno também do Programa de Pós Graduação em Análise Ambiental Integrada sob a orientação das professoras doutoras Juliana Gardenalli de Freitas e Mirian Chieko Shinzato.

O trabalho desenvolvido consistiu em testes de remediação térmica em amostras indeformada de solo sem contaminação coletados no município de Diadema por meio de um modelo físico tridimensional na forma de cilindro elaborado por Rodrigues (2019). No centro do modelo foi instalada uma resistência elétrica, com potência de 500 W no primeiro ensaio. Para o monitoramento da dissipação do calor foram utilizados 24 sensores próprios para captação de variação de temperatura, instalados de forma radial, gerando dessa variação por toda a coluna (RODRIGUES, 2019), sendo o modelo representado na Figura 4.



Fig. 4: Modelo Físico do aquecimento da coluna de solo. O fio vermelho representa a resistência e os fios amarelos, os sensores de temperatura.

O aquecimento em coluna foi realizado por 3 dias consecutivos e de acordo com os resultados obtidos dos sensores, as temperaturas que melhor representam o

aquecimento dessa amostra de solo são 350°C e 270°C (temperaturas alcançadas perto da resistência) e 100°C e 60°C (temperaturas médias de pontos mais distantes da resistência). A partir desses resultados de uma simulação de remediação térmica e da dissipação de calor, o desenho experimental desse estudo foi desenvolvido, adotando as temperaturas acima citadas e o tempo de aquecimento.

6.2.2 Microcosmos para o Aquecimento

A construção de microcosmos oferece a vantagem de permitir a investigação, sob condições controladas, dos efeitos de pressões seletivas, como nesse caso, a influência da temperatura sobre as comunidades microbianas.

Em frascos autoclavados, subamostras de 5 g de solo (peso úmido), foram saturados com 1 mL de água destilada estéril e aquecidos às temperaturas de 350°C, 270°C, 100°C e 60°C. O experimento foi realizado em quintuplicata. Após o aquecimento, os frascos foram incubados em temperatura ambiente de 24°C por diferentes períodos antes de serem sacrificados para análise da microbiota por métodos dependentes e independentes de cultivo: logo após o aquecimento (T_0) e após 10, 30, 60 e 90 dias de incubação (T_{10} , T_{30} , T_{60} e T_{90} , respectivamente).

O aquecimento foi realizado da seguinte forma: para as maiores temperaturas, 350° e 270°C, foi utilizado o forno mufla, já para as temperaturas de 100° e 60°C, a opção escolhida foi a utilização de estufas. Para as temperaturas de 350° e 270° C quando a temperatura desejada foi alcançada, ela foi mantida por uma hora antes de desligar o forno. Como a perda de calor dentro da mufla acontece de maneira lenta, para evitar um choque térmico e para simular o mais próximo possível da perda de calor que aconteceria em campo, em uma situação real de remediação térmica, o solo aquecido foi mantido na mufla até a temperatura dentro do forno se igualasse à temperatura ambiente. Para as temperaturas de 100° e 60°C, o solo foi incubado na estufa por 3 dias, de acordo com os experimentos realizados em coluna.

Após o aquecimento à 350°C, 270°C e 100°C, o solo foi saturado novamente com água destilada estéril, uma vez que toda água do solo evaporou durante o aquecimento, sendo esse procedimento adotado para simular a reintrodução de água em um fluxo subterrâneo. Como o solo à 60°C não perdeu toda sua umidade, esse procedimento não foi realizado com os solos aquecidos nessa temperatura. Para o tempo

inicial, T_0 , esse procedimento de saturação do solo também não foi realizado, buscando analisar de forma completa o impacto do aquecimento do solo.

Os frascos com solo aquecidos foram fechados com batoques de borracha e lacrados com tampas de alumínio (Figura 5) a fim de reduzir os riscos de contaminação e a evaporação da água do solo nos microcosmos.



Fig. 5: Microcosmos de solo aquecidos e lacrados, em período incubação.

6.3 Solo contaminado: experimento em microcosmos

Para a realização dos experimentos em microcosmos em solos contaminados, foram levados em consideração os resultados obtidos no aquecimento dos microcosmos com solos sem contaminação. A montagem dos microcosmos foi feita da mesma forma, em que 5 g de solo contaminado foram pesados e alocados em frascos de vidros estéreis e secos, saturados com água destilada estéril e aquecidos às mesmas temperaturas. Nessa segunda rodada de experimentos, o tempo em que os microcosmos foram submetidos ao calor foram alterados, considerando a perda de umidade do solo durante o aquecimento a 60° e 100°C , para os experimentos com solo sem contaminação, o tempo de aquecimento com os microcosmos com solo contaminados foram reduzidos para 2 horas em estufa. Já nas temperaturas de 350°C e 270°C , os experimentos se mantiveram os mesmos, em que os microcosmos foram aquecidos em forno mufla por uma hora nas temperaturas descritas para, em seguida, esfriassem lentamente até a temperatura ambiente. Houve também a introdução de água destilada estéril nos microcosmos aquecidos nas temperaturas de 350° e 270°C em que o solo perdeu toda a sua umidade.

Para a realização dos experimentos após o aquecimento, os tempos de incubação utilizados tiveram uma pequena modificação: T0 (sacrifício da amostra logo após o aquecimento); T10 (após 10 dias); T30 (após 30 dias); e T60 (após 60 dias), excluindo assim dessa segunda rodada de experimentos o tempo de incubação de 90 dias, pensando em aprimorar os experimentos e também considerando que os resultados obtidos nesse período de 60 dias são consistentes.

6.4 Análises da microbiota do solo nos microcosmos

Para investigar a influência da temperatura na comunidade bacteriana do solo nos microcosmos foram utilizados métodos dependentes e independentes de cultivo descritos a seguir. Os mesmos procedimentos foram adotados, tanto para os microcosmos com solo limpo quanto para o solo contaminado.

6.4.1 Contagem de Bactérias heterotróficas totais pela técnica da microgota

Para a realização da contagem de bactérias heterotróficas do solo dependentes de cultivo, alíquotas de 1g foram transferidas para 10 mL de solução de pirofosfato de sódio (PPi) 0,1% para promover a dispersão do solo (YU, 1995), agitadas no vórtex, por 2 minutos, para estimular a separação das células aderidas às partículas de solo e então mantidas em repouso por 30 minutos para a decantação das partículas maiores. Quando se trabalha com a metodologia de contagem em placa de Petri, é importante que somente um número limitado de colônias se desenvolva na placa, porque no momento que muitas colônias se desenvolvam gerando um volumoso número de células, dificultam sua contagem o que resulta em imprecisão nos resultados. Para que isso não ocorra, o inóculo inicial é diluído várias vezes em um processo de diluição seriada (TORTORA *et al.*, 2002). Nesse caso, o sobrenadante foi submetido a diluição decimal seriada até 10^{-5} .

As contagens em placa têm como premissa que cada bactéria viva, cresce e se divide para produzir uma única colônia. Porém, isso nem sempre é verdade, uma vez que as bactérias frequentemente crescem unidas em agregados ou cadeias, ou seja, uma colônia muitas vezes não resulta de uma única bactéria, mas de um curto fragmento de uma cadeia ou de um agregado bacteriano, então, a unidade de contagem em placa é denominada unidade formadora de colônia (UFC) (TORTORA *et al.*, 2002).

A quantificação da população cultivável foi feita de acordo com o método *Small Drop Assay System* (MAZZOCCO *et al.*, 2009), ou técnica da microgota,

modificado para que se ajustasse melhor aos objetivos e aos solos testados. Esse método permite processar grandes quantidades de amostras com maior eficiência e economia sem perda de precisão. Para a quantificação, 4 gotas de 10µL por diluição foram inoculadas em placas de Petri com meio TSA – ágar triptona de soja (Synth). Foram inoculadas as diluições 10^{-2} a 10^{-5} , incubadas à 30°C por 3 dias. A medida direta do crescimento microbiano nesse caso foi por meio da contagem em placas medindo populações bacterianas de células viáveis. O resultado de contagem foi então utilizado para estimar a densidade em 1 g de solo (1000 µL).

6.4.2 Contagem de bactérias heterotróficas totais pela coloração DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol)

Para a realização da contagem de micro-organismos presentes nas amostras de solo, através do método independente do cultivo, foi utilizada a coloração com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). O DAPI é um corante de DNA emitindo fluorescência azul (entre os comprimentos de onda 358/461 nm) ao se ligar às regiões AT (adenina-timosina) do DNA (THERMO FISHER, 2006).

Foram pesados de 0,15g de amostras de solo, diluídos em 1485 µL de pirofosfato de sódio 0,1% + 15 µL de tween 10, perfazendo a concentração final de 10%, considerando que o uso desses dois reagentes aumentou drasticamente a separação das células das partículas de sedimento (+130,40%) comparado à extração com apenas o pirofosfato de sódio, como apresentado no estudo de Lavergne, et al., 2014. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex por 15 minutos, e as amostras descansaram por 1 hora e meia para que as maiores partículas decantassem. O protocolo para montagem da lâmina, desenvolvido pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo se encontra no Anexo 1.

7 Resultados e Discussão

7.1 *Análise do solo após o aquecimento*

Para complementar a análise dos efeitos do aquecimento nos solos, as características do solo também foram levadas em consideração, visando complementar os resultados obtidos do aquecimento dos microcosmos.

Nos microcosmos aquecidos a 350 e 270°C, tanto com as amostras de solo sem contaminação quanto em solos contaminados, houve mudança na coloração e na textura do solo. A mudança de coloração, realizado de acordo com a Carta Munsell apresentando na tabela 2, é provavelmente atribuída à oxidação de compostos de ferro e magnésio em ambientes de altas temperaturas. A remoção ou pirólise do carbono orgânico também pode ter contribuído para a mudança de cor (MA, et al., 2014).

Tabela 2: Resultados da alteração de coloração pela Carta de Munsell

Cor	Temperatura de Aquecimento				
	Original	350°C	270°C	100°C	60°C
	10R 4/6	7,5R 2,5/3	10R	3/3 2,5YR 4/6	2,5 4/8
Vermelho	Bruno	Vermelho	Vermelho-	Amarelo	Vermelho- Amarelo

As mudanças na textura apresentados nos solos aquecidos a 350°C e 270°C são resultado da desidratação e degradação das estruturas minerais sob o aquecimento excessivo (O'BRIEN et al., 2018), relacionadas especialmente as modificações térmicas dos silicatos de ferro e alumínio liberados durante a combustão da matéria orgânica do solo (MOS) (KETTERINGS et al., 2000), causando a fusão das partículas de argila e por consequência, partículas de solo maiores (O'BRIEN et al., 2018; BADIA; MARTI, 2003). Relacionado diretamente ao aumento das partículas do solo tem-se também um aumento de porosidade e densidade do solo, como comprovado no estudo de Minzon (2019), em que demonstra um aumento de cerca de 9% na porosidade do solo em amostras aquecidas a 240°C e 300°C.

7.2 *Método dependente do cultivo: solo sem contaminação*

Para validar a técnica da microgota (MAZZOCCO et al., 2009), amostras das diluições seriadas preparadas como descrito no item 6.4.1, das amostras de solo

utilizadas como inóculo foram submetidas à contagem tradicional em placas, com espalhamento de 1 mL na superfície do meio TSA. Os resultados confirmaram a possibilidade de aplicação da técnica da microgota para a quantificação das bactérias heterotróficas.

As primeiras contagens realizadas em amostras de solo que serviram de controle (não aquecidas) indicaram uma população de bactérias heterotróficas na média de $4,3 \cdot 10^5$ UFC/g, e o seu crescimento em placa pode ser verificado na Fig. 4.

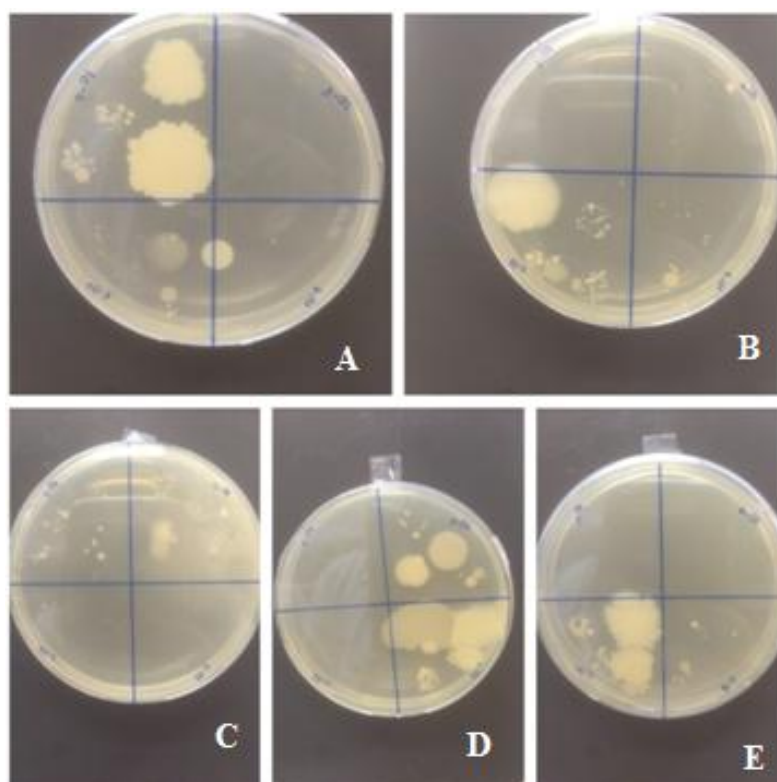


Fig. 4: Resultados controle da contagem de colônias de células heterotróficas do solo não contaminado. As imagens A, B, C, D e E apresentam o crescimento das células por meio da técnica da microgota em placa, resultado obtido do solo sem aquecimento e comparado com os resultados das contagens do crescimento na placa inteira. O experimento foi realizado em quintuplicada e cada imagem é uma amostra testada.

Importante ressaltar que os resultados obtidos em experimentos realizados para as contagens de células viáveis refletem o fato de que o crescimento de bactérias em laboratório é limitado por fatores como: a seletividade do meio de cultura, que em termos nutricionais, não consegue ser adequado para todas as espécies de bactérias presentes nas amostras de solo, resultando, portanto, no crescimento de apenas uma parte do total do número de bactérias; a outra limitação está relacionada ao fato de que

as bactérias frequentemente ocorrem no solo como colônias, e elas podem não se separar quando os solos são agitados ou diluídos, sendo assim, as estimativas das contagens tendem a ser abaixo do número real de bactérias no solo (ALEXANDER, 1961, RAMSAY, 1984; LINDAHL; BAKKEN, 1995).

Considerando a diversidade que uma amostra ambiental apresenta e que a variação entre as amostras de solo duplicadas é maior que a variação entre placas replicadas ou diluições replicadas de apenas uma amostra, optou-se pela utilização de subamostras do que placas replicadas da mesma diluição. Ou seja, para aumentar a variabilidade e pensando na diversidade que apresenta uma amostra ambiental, os experimentos foram realizados em quintuplicata (para cada temperatura e exposição ao tempo, foram montados 5 microcosmos), na tentativa de alcançar resultados mais precisos.

Os resultados obtidos no método dependente do cultivo refletem discussões anteriores sobre os efeitos do aquecimento da temperatura na microbiologia do solo. Nas temperaturas mais agressivas, de 350°C e 270°C, não houve crescimento de colônias nas placas, indicando uma grande redução das populações microbianas ou a esterilização do solo após o aquecimento. Os experimentos que foram feitos ao longo do tempo também resultaram em nenhum crescimento em placa, indicando que durante o aquecimento do solo em um processo real de remediação térmica, existe a esterilização do solo onde as temperaturas são mais agressivas.

Da mesma forma, quando aquecido a 100°C, as amostras de solo testadas não apresentaram crescimento em placa, indicando a sensibilidade da microbiota do solo ao aquecimento realizado. Seria esperado um aumento gradual e lento de possíveis micro-organismos sobreviventes ao aquecimento que iriam recolonizar o solo, como indicado em diversos estudos que existe um impacto inicial do aquecimento nas contagens (BARCENAS-MORENO; BAATH, 2009; GUERRERO et al., 2005; BADIA; MARTI, 2003) mas a contínua falta de crescimento em placa ao longo do tempo aponta para que mudanças físicas e químicas possam ter ocorrido, dificultando a recolonização nos experimentos com esse solo. Deve ser levado em consideração que no período de incubação toda a umidade do solo evaporou, não sendo possível manter a umidade constante no período dos 3 dias de aquecimento e que houve a reinserção da umidade após o aquecimento, mesmo assim, a perturbação da temperatura mais alta influenciou

diretamente na comunidade microbológica do solo, impossibilitando a manutenção de micro-organismos capazes de crescer em placa.

O solo não contaminado aquecido à 60°C foi o único que apresentou crescimento em placa, sendo seus resultados apresentados no Gráfico 1. Por ser a temperatura mais branda testada, durante o aquecimento de 3 dias, não houve perda total da umidade do solo.

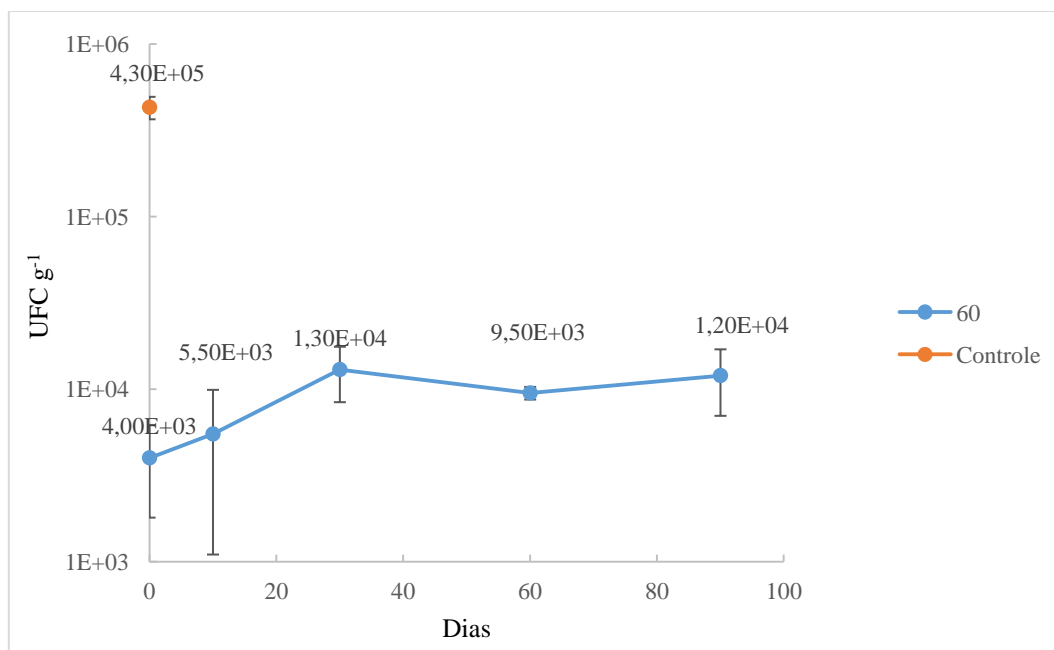


Gráfico 1: Comportamento da contagem de bactérias em placa ao longo do tempo em solos não contaminados aquecidos à 60°C.

Inicialmente, no T_0 , nos experimentos realizados logo após o aquecimento, foi observada uma queda consistente na contagem de colônias por grama de solo. Esse resultado indica que a perturbação existente com o aquecimento afeta de maneira direta a comunidade microbiana do solo, reduzindo o número de micro-organismos capazes de crescer em placa, pelo menos, inicialmente. Após um período de 10 dias, já é possível identificar a recolonização do solo que continua ao longo dos 90 dias de incubação dos microcosmos. Pode ser observado que para a recuperação total da microbiologia desse solo, seria necessário mais tempo ou seria necessária a reinserção de micro-organismos para acelerar o processo de recolonização do solo. Inúmeros fatores podem estar atrelados a esse resultado, como a extinção da matéria orgânica que pode ocorrer durante o aquecimento, à alteração da estrutura do solo, a perda de umidade, modificação do pH e entre outros.

As temperaturas alcançadas durante a remediação térmica e o tempo de aquecimento são fatores que impactam diretamente nas propriedades do solo como, por exemplo, o pH. Em temperaturas abaixo de 250°C, o pH do solo não muda ou se torna ligeiramente mais ácido com o aquecimento (O'BRIEN, et al., 2018), sendo essa diminuição provavelmente causado por algumas reações de oxidação, bem como a formação de íon bicarbonato (HCO_3^-) seguido da mineralização de dióxido de carbono (CO_2) associado com o aquecimento do solo (SIERRA et al., 2016; MA et al., 2014; BADIA; MARTI, 2003). Já o aquecimento acima de 250°C leva à combustão de matéria orgânica e, com isso, um aumento no pH por dois mecanismos: i) os ácidos orgânicos são destruídos, retirando sua influência da solução do solo (O'BRIEN, et al., 2018; PAPE et al., 2015; TEREFE et al., 2008); ii) as temperaturas mais altas e a desidratação dos coloides do solo deslocam íons de hidrogênio (H^+), substituindo por cátions alcalinos, que são abundantes na solução do solo após a combustão de matéria orgânica (O'BRIEN, et al., 2018; SIERRA et al., 2016; TEREFE et al., 2008; BADIA; MARTI, 2003). Portanto, solos com maiores concentrações de matéria orgânica terão maiores alterações no pH do solo, influenciando diretamente nas condições para que os micro-organismos se desenvolvam dependendo dessa alteração.

Considerando as faixas de temperatura ótimas que cada microrganismo possui para o seu crescimento e um limite acima do qual o seu desenvolvimento cessa, quando uma amostra de solo é aquecida, esse impacto é prejudicial para os micro-organismos. Examinando a diversidade de micro-organismos e a heterogeneidade do solo que proporciona micronichos e, assim, gradientes que podem proteger as células microbianas, diversos estudos indicam que a biomassa microbiana do solo total pode persistir em condições de aquecimento de 200°C a 400°C (ACEA; CARBALLAS, 1999; BARCENAS-MORENO; BAATH, 2009). No entanto, outros estudos relatam declínios em bactérias e fungos no aquecimento em temperaturas abaixo de 300°C (GUERRERO et al., 2005), sendo esses resultados particularidades de cada solo e microbiota de cada estudo.

Da mesma forma, embora estudos sempre indiquem que os organismos do solo diminuam imediatamente após o aquecimento, sua recuperação pode ser rápida, ocorrendo em 21 dias como no estudo conduzido por Barcenass-Moreno e Baath (2009), para um aquecimento menor que 300°C, como da mesma forma, a recuperação pode não ocorrer após um aquecimento mais intenso (>300°C) por mais de 100 dias

(GUERRERO et al., 2005) ou até mais de 270 dias (BADI; MARTI, 2003). Em temperaturas acima de 500°C, no entanto, a atividade microbiana pode não se recuperar sem o manejo adicional do solo, como adubação (PAPE et al., 2015).

De acordo com o estudo realizado por Van der Voort et al. (2016), a composição da comunidade biológica do solo muda após o aquecimento, favorecendo as espécies tolerantes ao calor. No geral, a capacidade de recuperação desses organismos depende das condições do solo após o tratamento, como a matéria orgânica, os nutrientes disponíveis e o teor de água. Além disso, os organismos são reintroduzidos no solo aquecido de alguma forma, uma vez que a maioria dos organismos é destruída no processo de aquecimento. Essa reintrodução pode ocorrer de forma natural por deposição de vento ou água (O'BRIEN et al., 2018) ou por processos de inserção de micro-organismos no solo.

O tratamento térmico do solo resulta na degradação de matéria orgânica (MO), uma vez que as temperaturas exigidas para remediar os contaminantes excedem as temperaturas os quais os componentes da MO se mantêm estáveis (O'BRIEN et al., 2018). Essa matéria orgânica é reduzida por meio de 3 mecanismos: i) volatilização de alguns componentes (destilação); ii) transformação e condensação (carbonização); e iii) oxidação (combustão) (CERTINI, 2005). A extensão da degradação depende da composição da MO e assim, como cada mecanismo interage com cada elemento da matéria orgânica.

A destilação de substâncias voláteis e a perda de carbono orgânico em solo começam em temperaturas entre 100 e 200°C, acima de 200°C se inicia o processo de carbonização. Temperaturas acima de 300°C exercem mudanças estruturais, principalmente na descarboxilação nas macromoléculas do solo (ácidos húmicos e fúlvicos) (GONZÁLEZ-PEREZ, et al., 2004)

Novamente, o tempo de aquecimento e as temperaturas alcançadas têm uma relação direta com os resultados de redução de matéria orgânica do solo. Em estudos conduzidos a temperaturas a 200°C por 15 minutos, a redução da matéria orgânica é de cerca de 10% (YI et al., 2016). Em temperaturas e tempos de aquecimento maiores, a redução de MOS pode atingir mais de 90% e a remediação latente por 60 minutos pode remover quase que inteiramente a MO (PAPE et al., 2015).

A alteração de MO com o tratamento térmico do solo também altera os nutrientes disponíveis e elementos. A combustão de MO leva a perda de C e N por volatilização (YI et al., 2016). Em temperaturas menores que 220°C, o aquecimento pode causar a mineralização do nitrogênio orgânico em íons de nitrato e amônio (GLASS et al., 2008). O fósforo do solo é mais resistente ao aquecimento e pode persistir mesmo quando a massa total do solo diminuiu devido ao aquecimento, aumentando assim, a concentração total de P após o aquecimento do solo (YI et al., 2016).

A redução da MO além de estar associada com menor atividade biológica e redução do ciclo de nutrientes também está associada com a redução da estabilidade do agregado do solo (SIX et al., 1998). Da mesma forma, a degradação da mineralogia da argila resulta em menor CTC e menor capacidade de retenção de água. Além disso, a transformação da MO em estruturas aromáticas condensadas a temperaturas mais baixas resulta em hidrofobicidade (O'BRIEN et al., 2004) afetando negativamente a capacidade do solo de sustentar micro-organismos.

7.3 Método dependente do cultivo: solo contaminado

A partir dos resultados obtidos na primeira rodada de aquecimento com o solo sem contaminação, alguns ajustes foram feitos na metodologia do estudo, principalmente no tempo de aquecimento das amostras. O solo sem contaminação foi exposto a um período mais longo de aquecimento, implicando na influência dos resultados de contagem e o fato de que a 60°C houve uma queda na contagem de células. Partindo da premissa que o tempo em que o solo é submetido a uma determinada temperatura em um processo de remediação térmica varia de acordo com cada contaminante e características do solo, optou-se, nessa fase dos experimentos em reduzir o tempo de aquecimento para otimizar os processos de aquecimento além de permitir uma compreensão de como o tempo de aquecimento pode influenciar nos resultados.

Nos aquecimentos a 350°C e 270°C, assim como o aquecimento no solo não contaminado, não houve crescimento de micro-organismos em placa, indicando que essas altas temperaturas afetam tanto a estrutura do solo, suas propriedades, quanto os micro-organismos existentes, resultando em uma possível esterilização do solo,

considerando que nem todos os micro-organismos do solo tiveram condições de crescer em placa.

Os resultados do teste da microgota a 100°C e a 60°C, no tempo de incubação de 30 dias, T30, são apresentados nas Figuras 5 e 6.

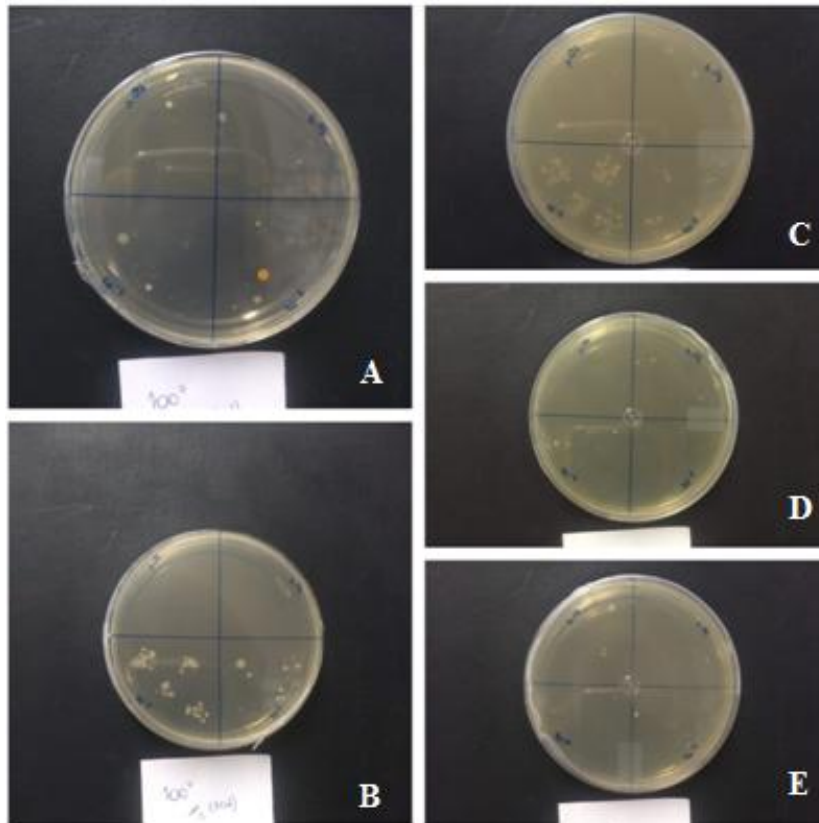


Fig. 5: Resultados controle da contagem de colônias de células heterotróficas do solo contaminado aquecido a 100°C após 30 dias do aquecimento. As imagens A, B, C, D e E representam o crescimento em placa pela técnica da microgota da amostra de um microcosmo em quintuplicada, sendo cada imagem

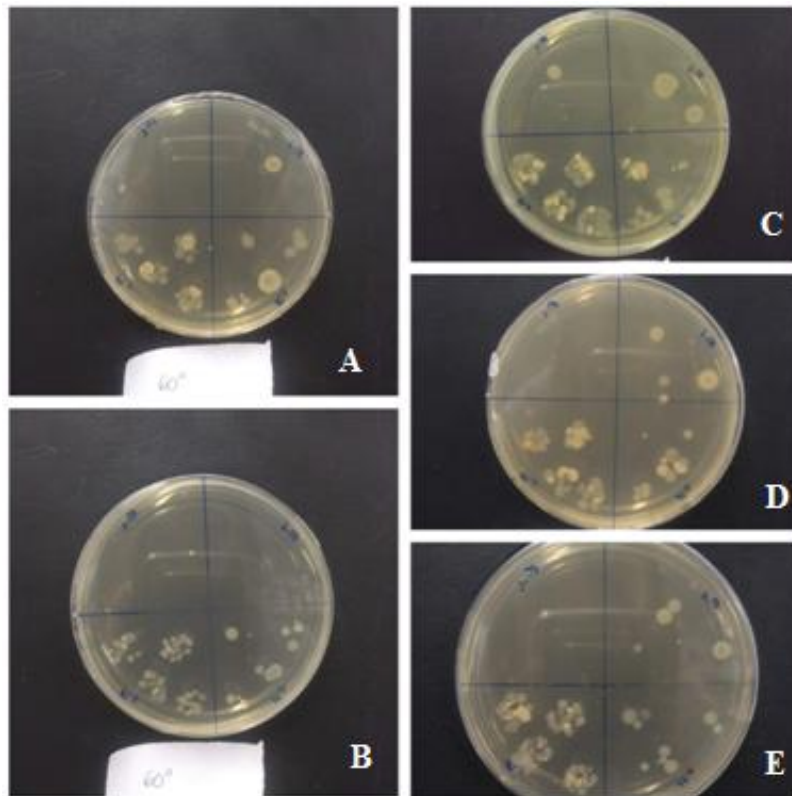


Fig. 6: Resultados controle da contagem de colônias de células heterotróficas do solo contaminado aquecido a 60°C após 30 dias do aquecimento. As imagens A, B, C, D e E representam o crescimento em placa pela técnica da microgota da amostra de um microcosmo.

Pelos resultados obtidos nas contagens no experimento da microgota, foi possível desenvolver o Gráfico 2, que relaciona o crescimento celular com o tempo de incubação em que foram submetidos os microcosmos após o aquecimento.

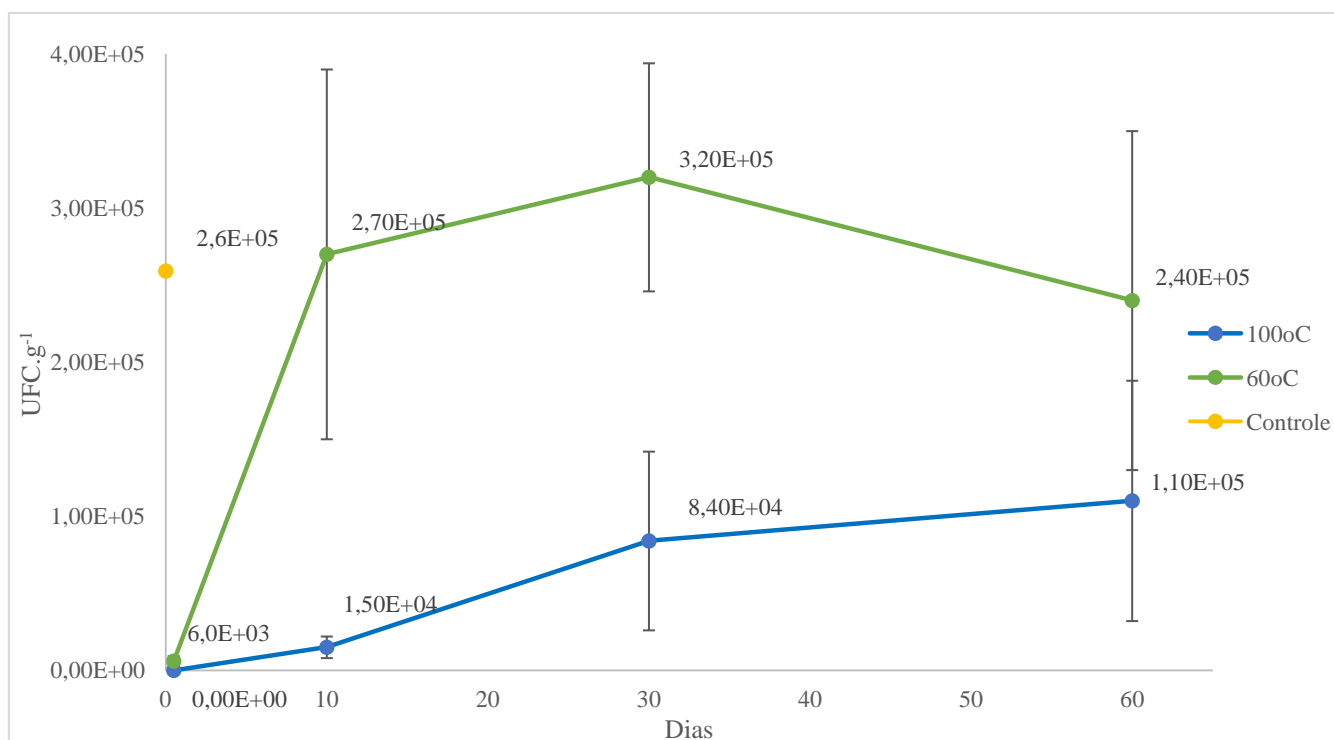


Gráfico 2: Comportamento da contagem de bactérias em placa ao longo do tempo em solo contaminado aquecido à 100°C e 60°C.

A contagem inicial de colônias pela técnica da microgota indicou um total de $2,6 \cdot 10^5$ UFC por grama de solo, apresentando um valor parecido com a contagem de colônias de micro-organismos do solo não contaminado ($4,3 \cdot 10^5$ UFC.g⁻¹). Esse resultado indica que, ao menos em número, a contaminação do solo não parece ser um fator limitante para o crescimento da comunidade microbológica do solo contaminado. Provavelmente, ao longo dos anos desde a contaminação inicial, espécies que conseguem utilizar os contaminantes como uma fonte de carbono se desenvolveram no solo.

No tempo T_0 , nos experimentos logo após o aquecimento do solo, os resultados indicam uma queda brusca na contagem de colônias de micro-organismos, indicando uma relação direta entre o aumento de temperatura e o impacto desse aquecimento na comunidade microbiana, reduzindo o número de colônias que são capazes de crescer em placa. Além da perturbação do aumento da temperatura, pode ser observado também que quanto maior a temperatura durante o aquecimento, maior essa perturbação é, como são apresentados nos resultados: a 60°C existe um decréscimo significativo nas contagens de colônias, mas a 100°C, logo após o aquecimento, nenhuma célula foi capaz de crescer em placa.

Em 10 dias de incubação, no tempo T10, já é possível notar a recuperação da comunidade microbiana do solo contaminado aquecido, principalmente o solo que foi aquecido a 60°C, apresentando resultados de contagens de colônias praticamente iguais ao do início dos experimentos. Nesse mesmo período de incubação, o solo aquecido a 100°C também apresentou uma recolonização do solo. Como o tempo de aquecimento nessas temperaturas foram modificados para esses experimentos, essa pode ser uma das causas que levaram a esses resultados. A distribuição desigual da temperatura no solo e a capacidade de algumas espécies assumirem formas de resistências como esporos e assim, continuar se reproduzindo e recolonizando o solo mesmo após o impacto do aquecimento também pode ser uma das causas.

Pelos resultados obtidos a partir da técnica da microgota, tanto no solo sem contaminação quanto o contaminado, tem-se que as temperaturas mais altas (350°C e 270°C) são agressivas o suficiente para eliminar todas as colônias de micro-organismos capazes de crescer em placa. No aquecimento a 100°C, nesse solo contaminado, após a perturbação inicial na contagem de colônias por causa do aquecimento, tem-se a recolonização do solo e que após 60 dias de incubação apresentou contagens de células na mesma ordem de grandeza que as contagens iniciais, o que indica, pelo menos em números e nas técnicas aplicadas, que houve a recuperação da comunidade microbiológica desse solo em um ambiente sem interferências externas.

Os contaminantes encontrados nesse solo podem ter uma influência nesses resultados por serem possíveis fontes de carbono para esses micro-organismos. Os pontos de ebulição dos contaminantes que estão presentes nesse solo são acima das temperaturas testadas (com a exceção do Cloreto de Vinila, que se encontra em estado gasoso em temperatura ambiente), como organizado na Tabela 1. Relembrando que um dos fatores que limitam a recolonização do solo por micro-organismo é a presença ou ausência de matéria orgânica e a extensão da degradação diante de altas temperaturas depende da composição dessa matéria orgânica, já que o aquecimento interage de maneira diferente com cada constituinte da matéria orgânica do solo. Nas temperaturas entre 100° e 200°C ocorre a destilação, volatilização e degradação de ligninas e hemicelulose (GONZALES – PEREZ, et al., 2004). Apesar das possíveis perdas de elementos da matéria orgânica do solo, durante a recolonização nos microcosmos, os micro-organismos que sobreviveram ao impacto do aquecimento podem também ter se utilizado dos contaminantes do solo, que se mantiveram no solo,

7.4 Método independente do cultivo

Os resultados com a utilização do corante DAPI demonstraram um comportamento de impacto do aquecimento similar aos resultados obtidos nas contagens dependentes do cultivo. Na Fig. 7 tem-se um dos campos de visão fotografados no microscópio de fluorescência.

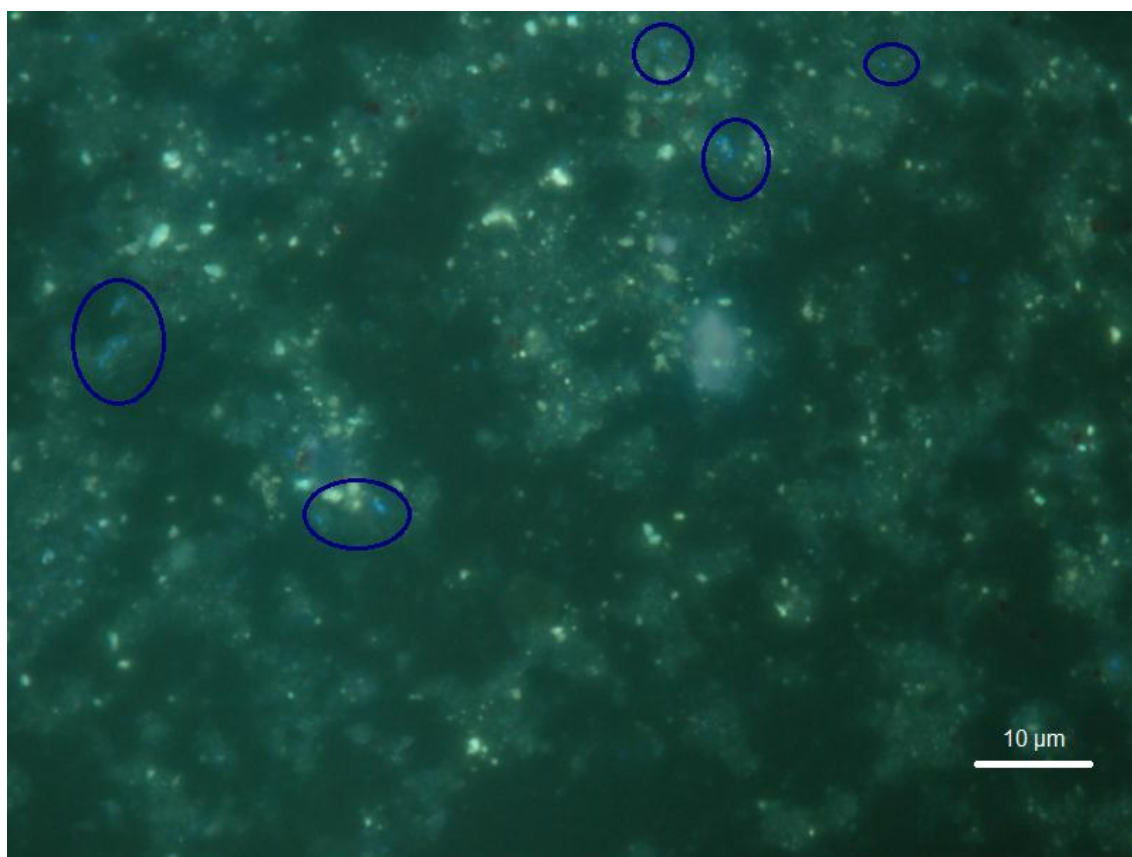


Fig. 7. Micrografia de fluorescência de amostra de solo de microcosmo. As células (viáveis ou não) se apresentam na coloração azul, típica do corante DAPI, utilizado. Essa amostra apresenta os resultados de contagem das amostras incubadas pelo período de 30 dias do solo aquecido a 60°C.

As contagens das amostras controle, ou seja, amostras de solo que não foram aquecidas indicaram uma média de $2,67 \cdot 10^7$ células por grama de solo. Os resultados obtidos ao longo do tempo, até 30 dias, estão apresentados no Gráfico 3 que relaciona o valor médio de células contadas por meio do DAPI relacionado com tempo (em dias).

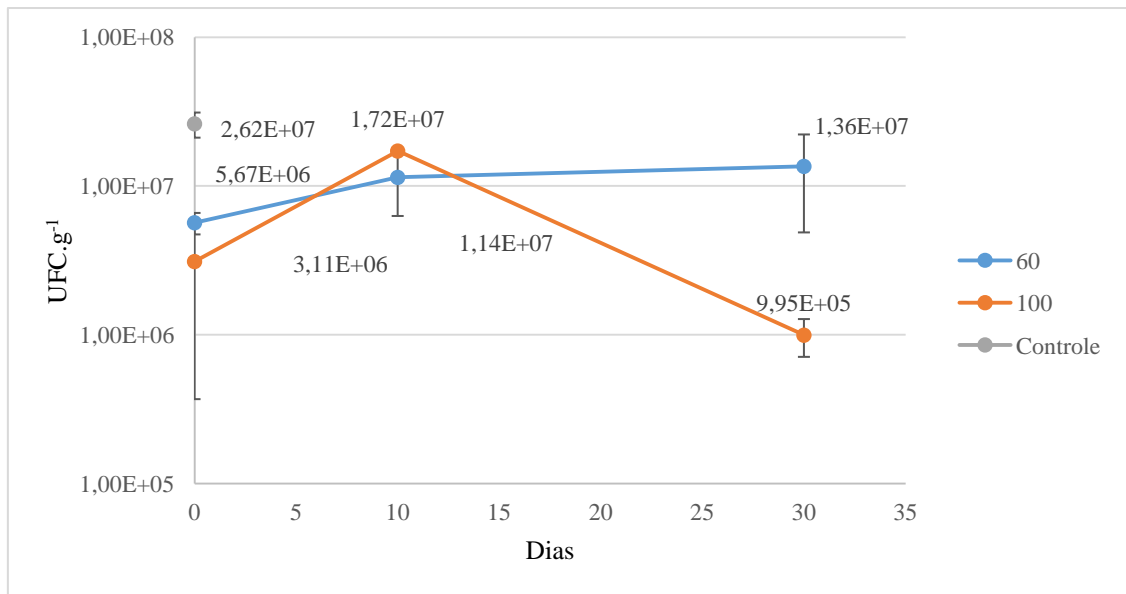


Gráfico 3: Comportamento da contagem de bactérias por meio da coloração DAPI ao longo do tempo em solos aquecidos a 60°C e 100°C.

Analisando os resultados obtidos, é possível observar uma relação direta e proporcional do aquecimento com o número de células contadas por meio do DAPI. Quando o aquecimento é mais agressivo, como no caso de 100°C, quando a umidade do solo evapora e algumas propriedades, como pH, matéria orgânica e estrutura do solo se alteram, esses fatores refletem diretamente no resultado de contagem de células do solo, ou seja, o resultado é a redução das células das amostras.

Da mesma forma, a temperatura mais branda testada, de 60°C, tem-se uma redução nas células contadas pela metodologia DAPI o que indicaria que parte dos micro-organismos do solo foram eliminados quando as temperaturas aumentaram e, comparando com os dados obtidos de contagem pela técnica da microgota, dentre os que permaneceram, apenas uma pequena parte permaneceu viável, recolonizando o solo com o tempo.

O aquecimento tem efeito significativo na habilidade do solo em sustentar comunidades microbianas, o que gera impactos na ciclagem de nutrientes, decomposição de matéria orgânica do solo, e, em solo com contaminação remanescente, a biorremediação de contaminantes residuais (CÉBRON et al., 2009). O sucesso da recolonização por micro-organismos é essencial para a recuperação sustentável do ecossistema, o que depende de muitos fatores, mas carbono, nitrogênio e fósforo são os fatores principais (PAPE, et al., 2015). Altas temperaturas são ainda mais propensas a

remover carbono e nutrientes e, como resultado, a recolonização microbiana desses solos torna-se severamente inibida (PAPE et al., 2015).

Uma das razões para o decréscimo significativo das células coradas à 100°C pode estar associado a perda de nutrientes ou ao esgotamento desses recursos que tornam viável a reprodução e a lenta recolonização das amostras aquecidas.

8 Conclusões e recomendações

O trabalho realizado confirmou em parte a hipótese de que o gradiente de temperatura gerado pelo tratamento térmico resulta na ocorrência de áreas em que se observa a eliminação dos micro-organismos do solo e áreas em que pode ocorrer estímulo da atividade microbiana.

Nas temperaturas mais altas testadas, 350°C e 270°C, em meio controlado, ocorreu a total esterilização tanto do solo contaminado quanto do solo sem contaminação. A 100°C e 60°C houve um impacto inicial negativo sobre a abundância celular e não houve estímulo do crescimento microbiano em nenhuma temperatura testada. Entretanto, houve recolonização do solo após 10 dias de incubação após aquecimento a 60 e 100°C, mostrando que, apesar do impacto, parte da comunidade microbiana resiste ao aquecimento.

São necessários estudos adicionais para compreensão do efeito do tempo que as amostras são submetidas ao aquecimento e sua influência nos resultados. Além disso, recomenda-se a análise da composição da microbiota submetida ao aquecimento em comparação com a microbiota do solo não aquecido para se compreender os impactos do processo sobre a diversidade e avaliar o processo de recolonização do solo.

9. Referências Bibliográficas

ABU-HAMDEH, N.; REEDER, R. C. Soil Thermal Conductivity Effects of Density, Moisture, Salt Concentration, and Organic Matter. *Soil Science Society of America Journal Abstract*, vol. 64, n. 4, p. 1285 – 1290, 2000.

ACEA, M. J; CARBALLAS, T. Microbial fluctuations after soil heating and organic amendment. *Bioresource Technology*, vol, 67, p. 65 – 71, 1999.

ALEXANDER, M. *Introduction to soil microbiology*. New York: Wiley. 1961.

BADIA, D.; MARTI, C. Plant Ash and Heat Intensity Effects on Chemical and Physical Properties of Two Contrasting Soils. *Arid Land Research and Management*, vol. 17, n.1, p. 23 – 41, 2003.

BADIN, A.; BROHOLM, M. M.; JACOBSEN, C. S.; PALAU, J.; DENNIS, P.; HUNKELER, D. Identification of abiotic and biotic reductive dechlorination in a chlorinated ethane plume after thermal source remediation by means of isotopic and molecular biology tools. *Journal of Contaminant Hydrology* , vol. 192, 1-19p. 2016.

BARCENAS – MORENO, G.; BAATH, E. Bacterial and fungal growth in soil heated at diferente temperatures to simulate a range of fire intensities. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 41, p. 2517 – 2526, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Agência Nacional de Águas. *Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil*. Brasília – DF, 432p. 2013.

CARVALHO, T. S.; JESUS, E. C.; BARLOW, J.; GARDNER, T. A.; SOARES, I. C.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology*, vol. 97, n. 10, p. 2760-2771, 2016.

CÉBRON, A.; BEGUIRISTAIN, T.; FAURE, P.; NORINI, M. P.; MASFARAUD, J. F.; LEYVAL, C. Influence of Vegetation on the In Situ Bacterial Community and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation in Aged PAH – Contaminated or Thermal-Desorption-Treated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, n. 19, p. 6322 – 6330, 2009.

CÉBRON, A.; CORTET, J.; CRIQUET, S.; BIAZ, A.; CALVERT, V.; CAUPERT, C.; PERNIN, C.; LEYVAL, C. Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research in Microbiology*, vol. 162, n. 9, p. 896 – 907, 2011.

CERTINI, G. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, vol. 143, n. 01, p. 1 – 10, 2005.

CHENU, C.; STOTZKY, G. Interactions between Microorganisms and Soil Particles: An Overview. In: HUANG, P. M.; BOLLANG, J. M.; SENESI, M. (Org). *Interactions Between Soil Particles and Microorganisms: Impact on the Terrestrial Ecosystem*. Nova York: John Wiley Professional, 2002. p. 3 – 40.

CLU-IN – Contaminated Site Clean-Up Information: Technologies. Disponível em: <https://clu-in.org/technologies/>. Acesso em: junho de 2017.

CONSTANZA, J.; DAVIS, E. L.; MULHOLLAND, J. A.; PENNEL, K. D. Abiotic Degradation of Trichloroethylene under Thermal Remediation Conditions. *Environmental Science & Technology*, vol. 39, 6825 – 6830p. 2005.

DETTMER, K. A Discussion of the Effects of Thermal Remediation Treatments on Microbial Degradation Processes. National Network of Environmental Management Studies Fellow for United States Environmental Protection Agency. Washington, DC (EUA), 25p, 2012.

FLETCHER, K. E.; CONSTANZA, J.; PENNEL, K. D.; LÖFFLER, F. E. Electron donor availability for microbial reductive processes following thermal treatment. *Water Research*, vol. 45, 6625 – 6636p. 2011.

FRIIS, A. K. The potential for reductive dechlorination after thermal treatment of TCE-contaminated aquifers. 2006. 59f. Dissertação (Tese Doutorado). Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark., Lyngby.

GLASS, W. D./ JOHNSON, W. D.; BLANK, R. R.; MILLER, W. W. Factors affecting mineral nitrogen transformations by soil heating: a laboratory-simulated fire study. *Soil Science*, vol. 173, n. 6, p 387 – 400, 2008.

GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; ALMENDROS, G.; KNICKER, H. The effect of fire on soil organic matter – a review. *Environmental International*, vol. 30, n. 6 , p. 855 – 870, 2004.

GUERRERO, C.; SOLERA-MATAIX, J.; GÓMEZ, I.; ORENES-GARCIA, F.; JORDÁN, M. M. Microbial recolonization and chemical changes in a soil heated at different temperatures. *International Journal of Wildland Fire*, vol. 14, p. 385 – 400, 2005.

GÜNTHER, W. M. R. Áreas Contaminadas no Contexto da Gestão Urbana. *São Paulo em Perspectiva*, São Paulo, v. 20, n.2, p. 105-117, 2006.

KETTERINGS, Q. M.; BIGHAM, J. M.; LAPERCHE, V. Changes in soil mineralogy and texture caused by slash-and-burn fires in Sumatra, Indonesia. *Soil Science Society of America Journal Abstract*, vol 64, n. 3, p. 1108 – 1117, 2000.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZEI, R. Na overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, vol. 71, p. 95 – 122, 2004.

LAVERGNE, C.; BEAUGEARD, L., DUPUY, C.; COURTIES, C.; AGOGUÉ, H. An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 105, p. 31 – 38, 2014.

LIGHTY, J. S.; SILCOX, G. D.; PERSHING, D. W. Fundamentals for the Thermal Remediation of Contaminated Soils: Particle and Bed Desorption Models. *Environmental Science Technologies*, vol. 24, n. 5, p. 750 – 757, 1990.

LINDAHL, V.; BAKKEN, L. R. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 12, n. 2, p. 135 – 142, 1995.

LU, Y.; LU, S.; HORTON, R.; REN, T. An Empirical Model for Estimating Soil Thermal Conductivity from Texture Water Content, and Bulk Density. *Soil Science Society of America Journal Abstract*, vol. 78, n.6, p. 1859 – 1868, 2014.

MA, F.; ZHANG, Q.; XU, D.; HOU, D.; LI, F.; GU, Q. Mercury removal from contaminated soil by thermal treatment with FeCl_3 at reduced temperature. *Chemosphere*, vol. 117, p. 388 – 393, 2014.

MARTY, F.; GHIGLIONE, J. F.; PAÏSSE, S.; GUEUNÉ, H.; QUILLET, L.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MUYZER, G. Evaluation and optimization of nucleic acid extraction methods for the molecular analysis of bacterial communities associated with corroded carbon steel. *Biofouling*, vol. 28, n. 4, p. 363-380, 2012.

MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; LINGOHR, E.; JOHNSON, R. P. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. In: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (Org.) *Bacteriophages: methods and protocols*. New York – NY (EUA). Ed. Humana Press, 2009. p. 81-85.

MUYZER, G.; DE WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington DC (EUA), vol. 59, 695-700p. 1993.

NAKAYAMA, C. R.; KUHN, E.; ARAÚJO, A. C. V.; ALVALÁ, P. C.; FERREIRA, W. J.; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARI, V. H. Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Amiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. *Deep-Sea Research II*, vol. 58, p. 128 – 138, 2011.

O'BRIEN, P. L.; DESUTTER, T. M.; CASEY, F. X. M.; KHAN, E.; WICK, A. F. Thermal remediation alters soil properties – a review. *Journal of Environmental Management*, vol. 206, p. 826 – 835, 2018.

PAPE, A.; SWITZER, C.; MCCOSH, N.; KNAPP, C. W. Impacts of thermal and smouldering remediation on plant growth and soil ecology. *Geoderma*, vol. 234 – 244, p. 1 – 9, 2015.

PAUL, E. A. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. 3^a Ed. Boston, MA: Elsevier, 2007. 535p.

QUEIROZ, L. L. Padrões de diversidade microbiana em sedimentos marinhos profundos influenciados por uma exsudação de asfalto. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAMSAY, A. J. Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 16, n. 5, p. 475 – 481, 1984.

RANJARD, L.; RICHAUME, A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, vol. 156, n. 8, p. 707-716, 2001.

ROCCA, A.C.C. Os passivos ambientais e a contaminação do solo e das águas subterrâneas. In: VILELA JR., A. DEMAJOVIC, J. (Org.). *Modelos e ferramentas de gestão ambiental: desafios e perspectivas para as organizações*. São Paulo: Ed. Senac, p. 247-284. 2006.

RODRIGUES, F. M. Estudo das Alterações Físicas em Solos Tropicais causadas pela Remediação Térmica. [Qualificação – Mestrado]. Diadema: Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 2018.

RODRIGUES, F. M. Estudo do Transporte de Calor e das Alterações Físicas em Solo Brasileiro Associadas com a Remediação. 2019. 81f [Tese Mestrado]. Diadema: Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 2019.

SÁNCHEZ, L. E. Revitalização de Áreas Contaminadas. In: Moeri, E; Coelho, R.; Marker, A. (orgs.), *Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas: Aspectos Técnicos, Legais e Financeiros*. São Paulo: Signus Editora, p. 79-90, 2004.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, vol. 17, n. 5, p. 914 – 921, 1994.

SÃO PAULO (Estado). Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. *Relação de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 14p. 2018.

SÃO PAULO (Estado). Decisão de Diretoria nº 256, de 24 de novembro de 2016. : Dispõe sobre a aprovação dos “Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2016” e dá outras providências. São Paulo, SP.

SIERRA, M. J.; MILLAN, R.; LOPEZ, F. A.; ALGUACIL, F. J.; CANADAS, I. Sustainable remediation of mercury contaminated soils by thermal desorption. *Environmental Science and pollution research international*, vol. 23, n. 5, p. 4898 – 4907, 2016.

SIX, J.; ELLIOT, E. T.; PAUSTIAN, K.; DORAN, J. W. Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. *Soil Science Society of America Journal*, vol. 62, n. 5, p. 1367 – 1377, 1998.

SUTHERSAN, S. S. et. al., *Remediation Engineering: Design Concepts*. 2ªEd. Boca Raton, FL: CRCPress, 627p. 2016.

TEREFE, T.; SANCHO-MARISCAL, I.; PEREGRINA, F.; ESPEJO, R. Influence of heating on various properties of six Mediterranean soils: a laboratory study. *Geoderma*, vol. 143, p. 272 – 280, 2008.

THERMO FISHER (Scientific) – DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindole) Nucleic Acid Stain Protocol. Waltham, MA (EUA), 5p. 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10ª Ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 938p. 2012.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 782 – 787, 1989.

USACE – United States Army Corps of Engineers. *Design: In Situ Thermal Remediation*. Washington, DC. 243p. 2014.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. *In Situ Thermal Treatment Technologies: Lessons Learned*. Washington – DC (EUA), 46p. 2014.

VALENTIM, L. S. O. Dez anos de gestão integrada de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista*, São Paulo, v. 8, n.94, p. 30-35, out. 2011.

WU, L.; VOMOCIL, J. A.; CHILDS, S. W. Pore Size, Particle Size, Aggregate Size, and Water Retention. *Soil Science Society of America Journal*, v. 54, n. 4, p. 952 – 956, 1990.

VAN DER VOOT, M.; KEMPENAAR, M. V. D.; RAAJMAKERS, J. M.; MENDES, R. Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecology Letters*, vol. 16, p. 375 – 382, 2016.

VIDONISH, J. E.; ZYGOURAKIS, K.; MASIELLO, C. A.; SABADELL, G.; ALVAREZ, P. J. J. Thermal Treatment of Hydrocarbon-Impacted Soils: A Review of Technology Innovation for Sustainable Remediation. *Engineering*, vol. 2, n.4, p. 426 – 437, 2016.

YI, Y. M.; PARK, S.; MUNSTER, CL., KIM G.; SUNG, K. Changes in Ecological Properties of Petroleum Oil-Contaminated Soil After Low-Temperature Thermal Desorption Treatment.

YU, W.; DODDS, W. K.; BANKS, M. K.; SKALSKY, J.; STRAUSS, E. A. Optimal Staining and Sample Storage Time for Direct Microscopic Enumeration of Total and Active Bacteria in Soil with Two Fluorescent Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, n. 9, p. 3367 – 3372, 1995.

ZEMAN, N. R.; RENNO, M. I.; OLSON, M. R.; WILSON, L. P.; SALE, T. C.; DE LONG, S. K. Temperature impacts on anaerobic transformation of LNAPL and concurrent shifts in microbial community structure. *Biodegradation*, vol. 25, n. 4, p. 569 – 585, 2014.

Anexo 1 – Protocolo para coloração DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo)

Reagentes

Álcool 50% em tubos falcon de 50 mL

Álcool 70% em tubos falcon de 50 mL

Álcool 100% em tubos falcon de 50 mL

Solução DAPI (1 μ g/ μ l)

Glicerol + PBS 1x (concentração?)

Água destilada

Amostra de solo: alíquota de 0,15g diluídos em 1500 μ L de pirofosfato de sódio e tween 10%

Modo de preparo:

1. Em lâmina de imunofluorescência, colocar, em cada poço, uma alíquota de 5 μ l de amostra espalhando-a por todo o pocinho com a ponteira;
2. Colocar a lâmina em estufa a 60°C e esperar secar;
3. Passar a lâmina, com auxílio de uma pinça, por banhos de álcool 50%, 70% e 100% em tubos de centrífuga de 50 ml por 3 minutos cada banho;
4. Deixar secar ao ar livre;
5. !!!Com ausência de luz!!! Colocar 10 μ l de solução DAPI (1ng/ μ l) em cada poço e espalhá-la por todo o poço usando a ponteira;
6. Deixar secar por 10 minutos na ausência de luz;
7. Lavar a lâmina com água destilada e esperar secar ao ar livre;
8. Colocar 7 μ l de solução de Glicerol + PBS 1x;
9. Cobrir a lâmina com lamínula e levar ao microscópio;
10. A lâmina pode ficar armazenada a 4°C para posteriores observações.